

PENGARUH PENAMBAHAN JUMLAH INOKULUM DAN DI-KALIAM HIDROGEN FOSFAT PADA FERMENTASI PRODUKSI DEKSTRAN

[Effect of Added Inoculum and Di-potassium hydrogen phosphate Concentration on the Fermentation of Dextran Production]

Triantarti^{El} dan Hendro Santoso^M

Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia
JLPahlawan 25 Pasuruan 67126

ABSTRACT

Dextran production is conducted by fermentation by using *Leuconostoc mesenteroides* which produces dextransucrase enzyme. Sucrose is converted to dextran by dextransucrase. Sucrose is a main carbon source in dextran fermentation. Hence, sugar cane juice mainly contains sucrose is potential material for dextran fermentation. The effect of inoculum concentration added at the beginning of fermentation of di-potassium hydrogen phosphate concentration in the medium were studied. *L. mesenteroides* B-512F was used. The results showed that there were no effect on optimum growth and dextran production when the inoculum concentration added at 1% and 5%(v/v). The only difference was inoculum at 1% (v/v) delaying the growth and dextran formation in comparison to the addition of 5%(v/v) inoculum. The optimum growth and dextran production were affected by di-potassium hydrogen phosphate concentration in the medium (0,5, 1,0 and 1,5% w/v). The growth was highest at di-potassium hydrogen phosphate concentration 1,5 % w/v. On the otherhand, dextran production was lower compared to the other treatments.

Kata kunci/key words: Dekstran/dextran, fermentasi/fermentation, inokulum/inoculum, di-kalium hidrogen fosfat/di-potassium hydrogen phosphate.

PENDAHULUAN

Untuk menghadapi tantangan persaingan global yang sangat ketat maka upaya diversifikasi produk dari tebu sudah sangat mendesak untuk dilakukan oleh industri gula nasional. Fermentasi untuk memproduksi dekstran merupakan salah satu bentuk diversifikasi produk dari tebu. Upaya ini memiliki nilai strategis karena sampai saat ini dekstran sebagai bahan baku industri masih harus diimpor. Dekstran adalah polimer dari glukosa dengan ikatan utama α -1,6 dengan cabang α -1,3 atau α -1,4. Penggunaan dekstran dalam industri sangat luas seperti dalam industri farmasi sebagai bahan pengisi infus dan formulasi obat-obatan; dalam industri makanan sebagai bahan pengental; demikian pula dapat digunakan sebagai bahan pengkapsulan enzim, protein dan mikroba yang sangat berguna untuk mempermudah pemasaran mikroba penting dalam keadaan *dormant state*, yang dapat diaplikasikan pada saat diperlukan baik dalam tanah ataupun daun-daun tanaman (Alsop, 1983; Barker *et al*, 1992; Yamaoka *et al*, 1995).

Fermentasi dekstran menggunakan bakteri *Leuconostoc mesenteroides* yang dapat memproduksi enzim dextransukrase sehingga mampu mengkonversi sukrosa menjadi dekstran (Alsop, 1983; Barker dan Ajongwen, 1990; Landon *et al*, 1993).

Dalam fermentasi dekstran, sukrosa merupakan sumber karbon utama. Oleh karena itu nira tebu memiliki potensi yang baik sebagai sumber sukrosa dalam media fermentasi untuk pembuatan dekstran. Triantarti dan Santoso (2002) memperoleh dekstran hasil fermentasi dengan menggunakan nira tebu sebagai sumber sukrosa. Dalam penelitian tersebut dekstran yang dihasilkan hanya sebesar 26,8 mg per g dengan sisa sukrosa yang masih cukup besar yaitu 40 mg per gram pada akhir fermentasi sehingga diduga masih terdapat potensi yang harus diketahui untuk meningkatkan hasil dalam fermentasi dekstran. Untuk menggali potensi tersebut maka dalam penelitian ini akan dikaji pengaruh penambahan jumlah inokulum dan di-kalium hidrogen fosfat terhadap fermentasi untuk produksi dekstran.

BAHATANMETODA

Bahan dan alat

Dalam penelitian ini digunakan mikroba yang diperoleh dari ATTC yaitu *Leuconostoc mesenteroides* B 512 F, suatu jenis bakteri komersial yang saat ini sangat luas digunakan untuk memproduksi dekstran. Nira Perahan Pertama diperoleh dari tebu varietas Ps 80-1424. Selain itu sukrosa, ekstrak khamir, tryptone, di-kalium hidrogen fosfat, agar, glukosa, natrium klorida, magnesium sulfat, thiamidum diklorida dan etanol. Peralatan utama yaitu fermenter, laminar air flow, centrifuge, spektrofotometer, pH meter dan refraktometer.

Metoda

Penyiapan inokulum dan komposisi medium fermentasi

Bakteri ditumbuhkan pada agar slants pada pH 7,0 dengan komposisi (b/v) yaitu sukrosa 2%, ekstrak khamir 0,5%, trypton 0,24%, di-kalium hidrogen fosfat 0,25% dan agar 2% (Shamala dan Prasad, 1995). Setiap dua bulan bakteri ini diregenerasi. Pemeliharaan bakteri juga dilakukan di dalam medium *All Purpose Tween Agar* (APTA) dengan komposisi nutrisi lebih lengkap yaitu untuk 1 liter APTA mengandung pepton casein 12 g, ekstrak khamir 7,5 g, glukosa 10 g, natrium klorida 5 g, trisodiumsitrat dihidrat 5,7 g, di-kalium hidrogen fosfat trihidrat 6,55 g, tween 0,02 g, magnesium sulfat pentahidrat 0,073 g, thiamidum diklorida 0,001 g dan agar 20 g (Triantarti dan Dufour, 1998). Regenerasi dilakukan setiap dua bulan. Penyimpanan bakteri pada medium APTA ini dapat bertahan hingga dua tahun dengan tidak menyebabkan perubahan karakter mikroba.

Untuk inokulum dilakukan pada medium dengan komposisi sama seperti medium pada pembuatan agar *slants* namun tanpa penambahan agar. Permukaan agar miring yang mengandung biakan bakteri *L. mesenteroides* B 512 F dibasahi dengan 4 ml larutan NaCl 0,9%, kemudian digosok dengan loop pada permukaan agar sehingga suspensi bakteri dapat dipindahkan seluruhnya ke dalam 100 ml medium "pre culture" (inokulum) yang telah steril. Inkubasi dilakukan dengan digoyang menggunakan shaker selama 18 jam pada suhu ruang.

Komposisi medium fermentasi (b/v) adalah sebagai berikut: sukrosa 20 %, ekstrak khamir 0,5%, tryptone 0,25%, di-kalium hidrogen fosfat 0,5; 1 dan 1,5%, serta pH 7,0 - 7,2. Fermentasi dilakukan pada skala 50 ml pada suhu ruang dengan dua kali ulangan.

Pengaruh penambahan jumlah inokulum

Fermentasi dilakukan dalam 22 buah erlenmeyer 100 ml masing-masing berisi 50 ml medium. Perlakuan jumlah inokulum yang diujikan adalah 0,5 ml (1% terhadap medium) dan 2,5 ml (5% terhadap medium). Untuk setiap perlakuan terdiri dari 11 buah erlenmeyer lalu diinkubasi masing-masing selama 0,4, 8, 12, 16, 20, 24, 28; 32 dan 40 jam. Pada akhir inkubasi dilakukan inaktivasi enzim dengan memasukkan erlenmeyer ke dalam air mendidih selama 10 menit. Sebelum sterilisasi pH diatur menjadi 7,0 dan pada awal fermentasi pH 7,4. Fermentasi dilakukan pada suhu ruang dengan dua kali ulangan.

Pengaruh variasi kadar di-kalium hidrogen fosfat

Fermentasi dilakukan dalam 27 buah erlenmeyer 100 ml • masing-masing berisi 50 ml medium. dengan jumlah pre culture 5% terhadap medium. Diujikan 3 perlakuan kadar di-kalium hidrogen fosfat yaitu 0,5, 1,0 dan 1,5% (b/v). Untuk setiap perlakuan terdiri dari 9 buah erlenmeyer lalu diinkubasi masing-masing selama 0,4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 dan 36 jam. Pada akhir inkubasi dilakukan inaktivasi enzim dengan memasukkan erlenmeyer ke dalam air mendidih selama 10 menit. Sebelum sterilisasi pH diatur menjadi 7,0 dan pada awal fermentasi pH 7,4. Fermentasi dilakukan pada suhu ruang dengan dua kali ulangan.

Analisis laboratorium

Untuk mengevaluasi hasil, dilakukan analisis laboratorium yaitu brix, pH, Pol, gula reduksi masing-masing menggunakan metoda ICUMSA (1990); kadar dekstran menggunakan metoda Keniry *et al* (1969).

HASIL

Penambahan jumlah inokulum dan perubahan kadar dekstran

Pada Gambar 1 disajikan kurva pertumbuhan *L. mesenteroides* B 512 F selama fermentasi produksi dekstran berlangsung pada penambahan jumlah

inokulum yang berbeda. Pada Gambar 2, Gambar 3 dan Gambar 4 disajikan masing-masing perubahan kadar dekstran, fruktosa dan pH pada kondisi fermentasi yang sama.

Pengaruh variasi kadar Di-kalium Hidrogen Fosfat dan perubahan kadar dekstran

Pada Gambar 5 disajikan kurva pertumbuhan sel selama fermentasi berlangsung dengan perlakuan variasi kadar di-kalium hidrogen fosfat sedangkan pada Gambar 6 dan Gambar 7, disajikan masing-masing kurva perubahan kadar dekstran dan pH selama fermentasi berlangsung pada perlakuan yang sama.

PEMBAHASAN

Pengaruh penambahan jumlah inokulum

Dalam percobaan ini pertumbuhan sel diukur dengan metode spektrofotometris pada panjang gelombang 900 nm dengan cara pengukuran absorbansi. Metode ini dapat menggambarkan adanya tingkat populasi sel sehingga terlihat kurva pertumbuhan sel meningkat hingga jam ke 25 dan setelah itu mengalami *stagnasi* (Gambar 1). Pada perlakuan inokulum sebesar 5% (v/v), pertumbuhan awalnya lebih cepat dibandingkan perlakuan inokulum 1% (v/v) namun keduanya akan mengalami stagnan pada tingkat pertumbuhan yang sama (lihat Gambar 1). Kurva perubahan kadar dekstran pada perlakuan inokulum yang berbeda menunjukkan pola yang sama dengan kurva pertumbuhan sel (lihat Gambar 1 dan 2). Hal ini menunjukkan bahwa pada fase pertumbuhan eksponensial pada saat sel hanya mengkonsumsi sukrosa sebagai sumber energi, maka enzim dekstransukrase diproduksi oleh sel dengan jumlah yang proporsional dengan pertumbuhan sel (Dols *et al*, 1997). Gambar 2 juga menunjukkan bahwa pada perlakuan penambahan jumlah inokulum 1% (v/v) kecepatan pembentukan dekstran lebih lambat dibandingkan perlakuan inokulum yang lebih banyak (5% v/v) namun ketika pertumbuhan dekstran maksimum, kadar dekstran yang dicapai relatif sama diantara dua perlakuan tersebut. Gambar 3 menunjukkan perubahan kadar fruktosa selama fermentasi dekstran. Selama pertumbuhan sel dalam medium fermentasi, sukrosa sebagai sumber karbon

akan dikonversi menjadi dekstran dan fruktosa oleh enzim dekstransukrase. Menurut Dolls *et al* (1997), sebagian lagi dari sukrosa akan masuk ke dalam sel kemudian dimetabolisme lebih lanjut menjadi laktat, asetat dan etanol sedangkan gugus fruktosa terakumulasi dalam medium fermentasi bersama-sama dengan sisa fruktosa dari sintesa dekstran. Pada Gambar 3 dapat dilihat bahwa pada saat kadar fruktosa mencapai maksimum berarti sukrosa dalam medium mencapai minimum dan pertumbuhan sel terhambat sehingga sel akan mengkonsumsi fruktosa hingga kadar fruktosa mencapai minimum (Gambar 3). Pada Gambar 4 ditunjukkan adanya perubahan pH selama fermentasi berlangsung. Terjadi penurunan pH yang lebih cepat pada inokulum 5% dibandingkan dengan perlakuan 1%. Penurunan pH yang cepat ini ternyata berbanding lurus dengan pertumbuhan sel yang juga cepat pada perlakuan yang sama (lihat Gambar 1). Hal ini terjadi karena asam yang diproduksi berkorelasi positif terhadap pertumbuhan sel.

Pengaruh variasi kadar di-kalium hidrogen fosfat

Gambar 5 menunjukkan bahwa pada perlakuan di-kalium hidrogen fosfat 0,5% (b/v), sel sel tumbuh lebih awal tetapi kemudian mengalami stagnasi lebih awal pula sehingga tingkat pertumbuhan sel amat rendah dibandingkan dengan perlakuan kadar di-kalium hidrogen fosfat 1% dan 1,5% (b/v). Hal ini menunjukkan bahwa kadar di-kalium hidrogen fosfat dapat meningkatkan populasi sel (Gambar 5). Tingkat pertumbuhan sel dapat dindikasikan oleh perubahan derajat keasaman. Pada pH 4,5 - 4,8 pertumbuhan sel sudah mulai menurun seiring dengan semakin menipisnya persediaan sukrosa dalam medium (Dolls *et al*, 1997; Triantartidan Dufour, 1998). Pada perlakuan kadar di-kalium hidrogen fosfat dalam medium sebesar 0,5% dan 1% (b/v), pertumbuhan sel mulai terhambat ketika medium fermentasi mencapai pH 4,5 - 4,8, namun pada saat itu masih terjadi kenaikan kadar dekstran (lihat Gambar 6). Hal ini terjadi karena diduga bahwa pada pH tersebut enzim dekstransukrase masih aktif walaupun tidak optimal lagi (Triantarti dan Dufour, 1998).

Berbeda dengan dua perlakuan terdahulu, maka pada perlakuan penambahan di-kalium fosfat 1,5% (b/

v), tidak terjadi kenaikan kadar dekstran setelah pertumbuhan sel mengalami *stagnasi* karena kemungkinan sukrosa sebagai substrat sudah tidak lagi tersedia dalam medium. Pada Gambar 6 dapat dilihat bahwa antara 4 - 12 jam fermentasi, bakteri memasuki fase pertumbuhan eksponensial. Dolls *et al*, (1997) mengatakan bahwa fase pertumbuhan eksponensial terjadi ketika bakteri masih mengkonsumsi sukrosa sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan dan enersinya sehingga produksi enshn dekstransukrase proporsional dengan pertumbuhan populasi selnya. Pada perlakuan di-kalium hidrogen fosfat 1,5% (b/v), pH medium berubah dari pH 7,2 menjadi pH 6,5 dimana pada kisaran tersebut enzim dekstransukrase yang disekresikan dari dalam sel lebih cepat mengalami inaktivasi. Hal ini terjadi karena enzim tidak berada pada kisaran pH yang ideal bagi optimalnya aktivitas dan stabilitas enzim yakni pada pH 5,0 - 5,5 (Kobayashi *et al*, 1985; Landon dan Webb, 1990; Michelena *et al*, 1999; Triantarti dan Dufour, 1998).

Pada perlakuan di-kalium hidrogen fosfat 0,5% (b/v), perubahan pH terjadi dari pH 7,2 menjadi pH 5,0. Pada kisaran pH ini, enzim dekstransukrase yang dihasilkan masih memungkinkan mencapai aktivitas dan stabilitas optimum. Oleh sebab itu kurva perubahan kadar dekstran pada waktu fermentasi antara 4 - 12 jam dengan perlakuan di-kalium hidrogen fosfat 0,5% dan 1 % dapat mencapai tingkat kadar dekstran yang lebih tinggi dari perlakuan di-kalium hidrogen fosfat 1,5% (lihat Gambar 6). Antara 12 - 20 jam fermentasi dapat dilihat bahwa pada perlakuan kadar di-kalium hidrogen fosfat 1,5% (b/v) masih terlihat adanya pertumbuhan dan peningkatan kadar dekstran yang disebabkan oleh perubahan kisaran pH medium dari pH 5,5 - 5,0 (Gambar 7) yang merupakan kisaran pH ideal bagi optimumnya aktivitas dan stabilitas enzim dekstransukrase. Pada perlakuan kadar di-kalium hidrogen fosfat 0,5% dan 1% (b/v) pertumbuhan sudah tidak menunjukkan peningkatan yang berarti (lihat Gambar 5) namun dekstransukrase yang disekresikan masih mampu menghasilkan dekstran dari substrat sukrosa yang masih tersisa dalam medium (Gambar 6).

KESEMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan beberapa aspek sebagai berikut:

- Penambahan variasi jumlah inokulum terhadap medium fermentasi sebesar masing-masing 1% dan 5% (v/v) tidak berpengaruh terhadap tingkat pertumbuhan maksimum dari *L. mesenteroides* dan kadar dekstran yang dihasilkan.
- Perlakuan variasi kadar di-kalium fosfat dalam medium fermentasi sebesar 0,5% ; 1,0% dan 1,5% (b/v) berpengaruh terhadap tingkat pertumbuhan *L. mesenteroides* dan kadar dekstran yang dihasilkan.
- Pada perlakuan kadar di-kalium fosfat sebesar 1,5% (b/v) dihasilkan pertumbuhan mikroba yang semakin meningkat namun kadar dekstran yang dihasilkan lebih rendah dibandingkan dua perlakuan yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Alsop RM. 1983. Industrial production of dextrans. Dalam: Bushell ME (Ed.), *Progress Industrial Microbiology* Vol. 18 (Microbial Polysaccharides). Elsevier, Amsterdam, Him 1-43.
- Barker PE and NJ Ajongwen. 1990. The production of the enzyme dextransucrase using nonaerated fermentation techniques. *Biotechnology and Bio engineering* 37, 703-707.
- Barker CZ, AA Brooks, RZ Greenly and JM Henis. 1992. *Encapsulation of biological material in non-ionic polymer beads*. US Patent No. 05089407.
- Dols M, W Chraibi, MR Simeon, ND Lindley and PF Monsan. 1997. Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. *Applied and Enviromental Microbiology* 63 (6), 2159-2165.
- ICUMSA, 1994. Report of Proceeding of the 21th Session International Commision for Uniform Methods of Sugar Analysis.
- Keniry JS, Lee JB and VC Mahoney, 1969. Improvements in the dextran assay of cane sugar materials. *International Sugar Journal* 71, 131-135.
- Kobayashi M, I Yokoyama and K Matsuda, 1985. Effectors differency modulating the dextransucrase activity of *Leuconostoc*

mesenteroides. *Agricultural Biological Chemistry* 52 (12):3169-3171.

Landon RS, ffHudson, WKramer and C Webb. 1993. A model of dextransucrase synthesis by *Leuconostoc mesenteroides*. *Trans Ichem E 72 Part C* - December, 209-215.

Landon RS and C Webb. 1990. Separating enzyme (dextransucrase) production and product (dextran) synthesis within a traditional fermentation process. *Process Biochemistry* - February, 19-23.

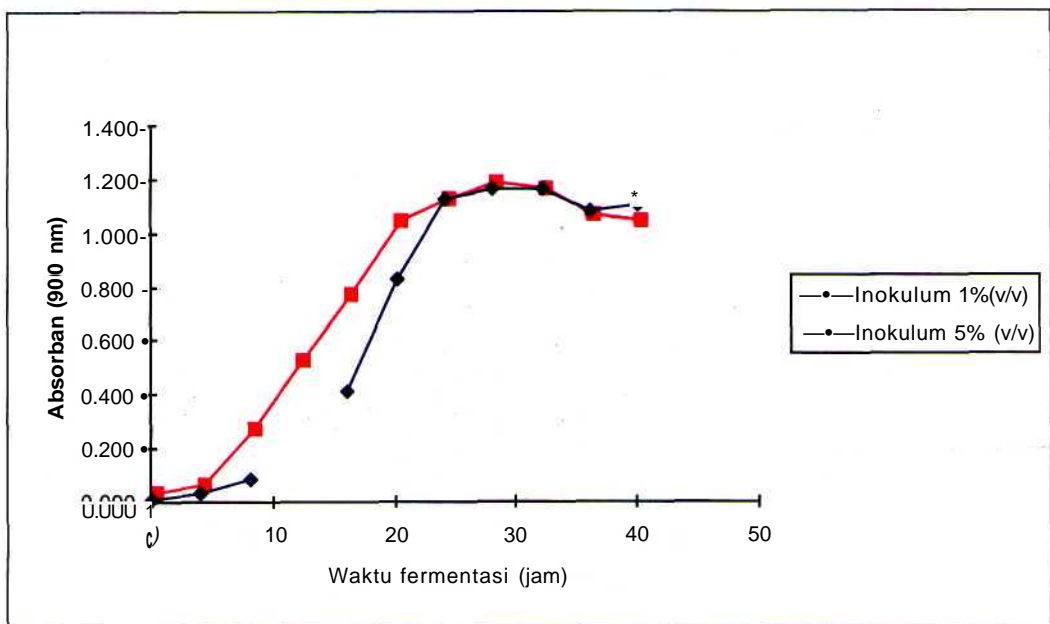
Michelena G, A Martinez, A Bel and O. Almazan. 1999. Technological optimization of dextransucrase enzyme production. *Proc. ISSCT Congress*, New Delhi, India, Co-P6,408-414.

Shamala TR and Prasad MS. 1995. Preliminary studies on the production of high and low viscosity dextran by *Leuconostoc* spp. *Process Biochemistry* 30(3), 237-241.

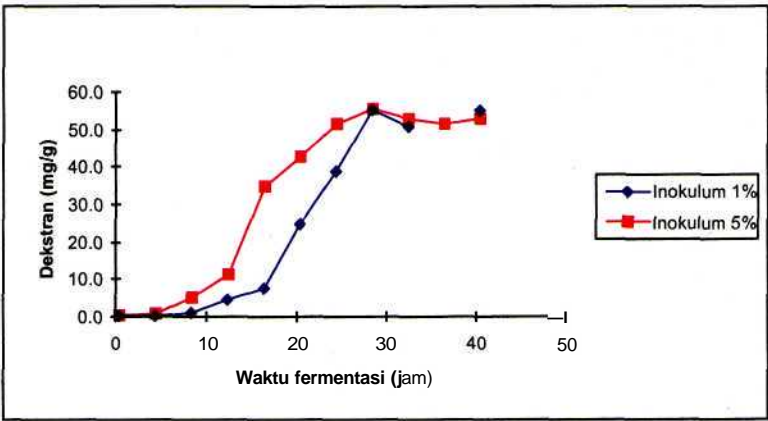
Triantarti and JP Dufour. 1998. Dextran formation and effect of Maillard Reaction Product in relation with medium viscosity during fermentation of *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 10830. Master Thesis. University of Otago, Dunedin, New Zealand.

Triantarti dan H Santoso. 2002. Nira tebu sebagai medium fermentasi untuk produksi dekstran. *Prosiding Seminar Nasional Kimia IV*. Institut Teknologi Sepuluh November. Surabaya. Him 193-197.

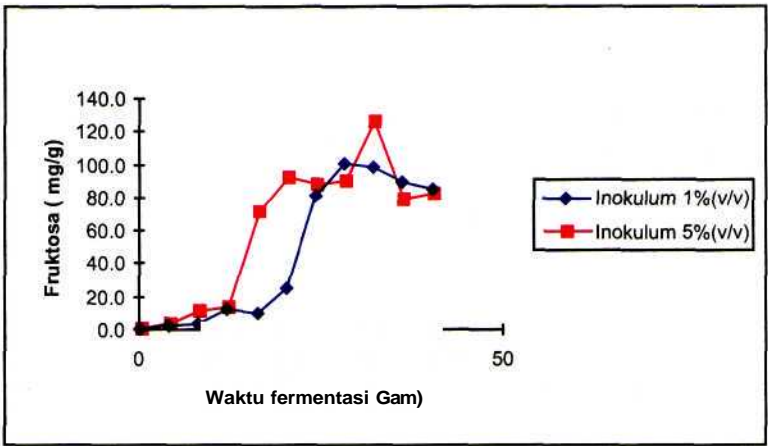
Yamaoka T, M Kuroda, Y Tabata and Y Ikada. 1995. Body distribution of dextran derivatives with electric charges after intravenous administration. *International Journal of Pharmaceutics (Netherland)* 113(16), 149-157.



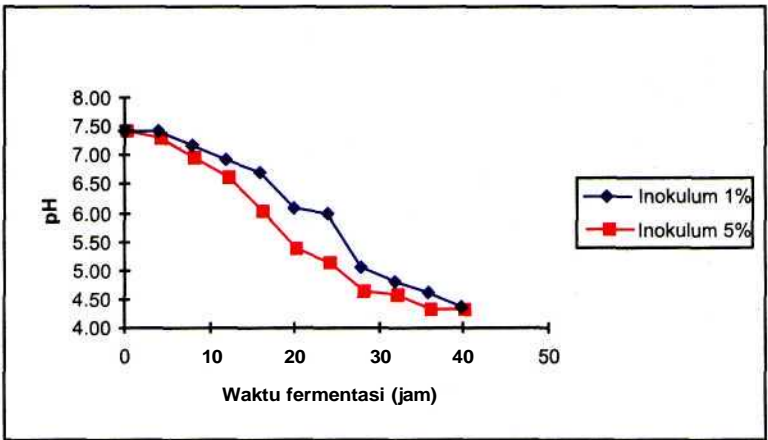
Gambar 1. Kurva pertumbuhan *Z. mesenteroides* B 512 F selama fermentasi dekstran dengan penambahan jumlah inokulum 1% dan 5% (v/v terhadap medium fermentasi).



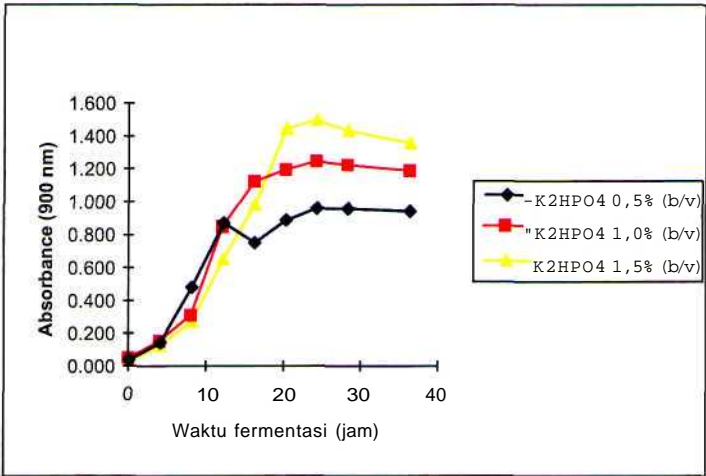
Gambar 2. Kurva perubahan kadar dekstran selama fermentasi dengan penambahan jumlah inokulum 1% dan 5% (v/v terhadap medium fermentasi).



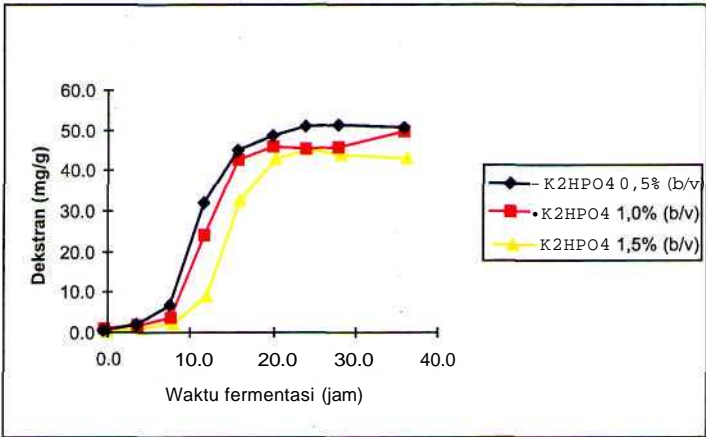
Gambar 3. Kurva perubahan kadar fruktosa selama fermentasi produksi dekstran dengan penambahan jumlah inokulum 1% dan 5% (v/v terhadap medium fermentasi).



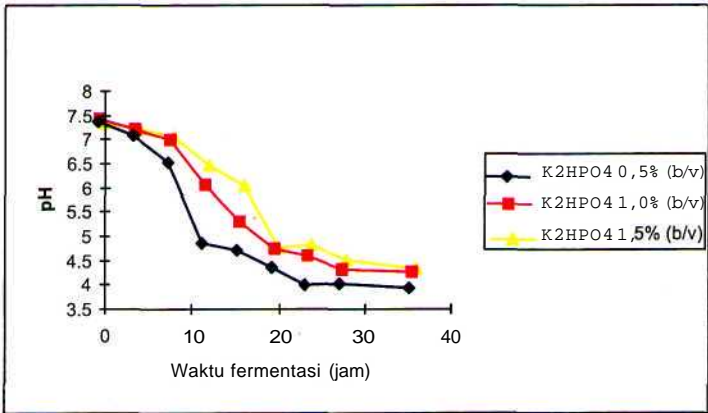
Gambar 4. Kurva perubahan derajat keasaman (pH) selama fermentasi dekstran dengan penambahan jumlah inokulum 1% dan 5% (v/v terhadap medium fermentasi).



Gambar 5. Kurva pertumbuhan *L. mesenteroides* B 512 F selama fermentasi dekstran dengan variasi penambahan jumlah K₂HPO₄(b/v terhadap medium fermentasi).



Gambar 6. Kurva perubahan kadar dekstran selama fermentasi dengan variasi penambahan jumlah K₂ HPO₄ (b/v terhadap medium fermentasi).



Gambar 7. Kurva perubahan derajat keasaman (pH) selama fermentasi dekstran dengan variasi penambahan jumlah K₂ HPO₄ (b/v terhadap medium fermentasi)